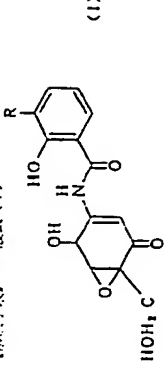


(5) Int. Cl. ⁶	識別記号	片内図番番号	P I	技術表示箇所
C 07 D 303/38	ABG		C 07 D 303/38	
A 61 K 31/335			A 61 K 31/335	ABG
C 12 P 17/02			C 12 P 17/02	
// (C 12 P 17/02)				
C 12 R 1:01				
審査請求 承請求 願事項の概3 O L (金 15 頁)				
(21)出願番号	特開平8-199249	(71)出願人	000173913	
(22)公開日	平成8年(1996) 7月29日	財団法人微生物化学研究会		
		東京都品川区上大崎3丁目14番23号		
		竹内 富雄		
		(72)発明者		
		東京都品川区東五反田5丁目1番11号 二		
		ユーブジマンシヨン701		
		(72)発明者		
		土田 外志夫		
		神奈川県相模原市矢部2丁目3番24号 ハ		
		一モ二矢部201号		
		(72)発明者		
		中村 光		
		(74)代理人		
		東京都台東区入谷2丁目39番地9号		
		弁護士 八木田 茂 (外2名)		
				最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗生物質エポキシノマイシンCおよびDとその製造法ならびに抗リウマチ剤

(57) 【要約】
【課題】 抗リウマチ活性を有し且つ新しい分子特長を有する新規な化合物を提供することを目的とする。
【解決手段】 一般式 (1)



(式中、RはエポキシノマイシンCでは水素原子を示し、エポキシノマイシンDでは塩基を示す) で表わされるエポキシノマイシンCおよびエポキシノマイシンDが新規な抗生物質としてアミコラトブシス sp. MK299-9 514 株の培養により得られた。エポキシノマイシンCおよびD、あるいはそれらの塩は抗リウマチ活性を有する抗生物質である。また、先に知られた新規な抗生物質であるエポキシノマイシンAおよびエポキシノマイシンBも抗リウマチ活性を有することが見いだされた。

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、抗リウマチ活性を示す新規化合物であるエポキシノマイシンE[epoxylin oalicin] CおよびエポキシノマイシンD、あるいはこれらの塩に、またエポキシノマイシンCおよび(または)エポキシノマイシンDの製造法に関する。さらには本発明は、エポキシノマイシンCおよび(または)エポキシノマイシンD、エポキシノマイシンAおよびエポキシノマイシンBまたはそれらの塩のうち少なくとも一つの化合物を有効成分とする抗リウマチ剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 種々なる数の抗生物質が知られており、また種々なる数の抗腫瘍性物質が知られている。他方、従来のリウマチ治療には、ステロイド剤、鎮痛剤、免疫調節剤または免疫調節剤等が使われている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 細菌感染症の化学療法において、従来の薬剤は使用されている既知の抗生物質と異なり、異なる化学構造を有し且つ優れた抗腫瘍性を示す新しい化合物の発見または創製することは常に望まれている。また抗腫瘍性物質は、一般に強い毒性を有するものが多く、毒性が低く且つ新規な化学構造を有する抗腫瘍性物質を発見または創製することが常に望まれており、そのための研究が行われている。

【0004】

また、従来のリウマチ治療で用いられたステロイド剤および免疫調節剤には、種々の副作用があることが問題であり、また時性免疫抑制剤は付随症である等の問題から、真に有効なリウマチ治療の出現が望まれている。そこで、リウマチの治療または予防に有効であり且つ副作用がないまたは弱い新規な抗リウマチ剤を提供することが要望されている。本発明の主な目的の一つは、新規な抗リウマチ剤を提供することにある。

【0005】

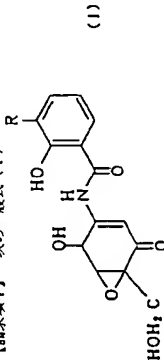
【課題を解決するための手段】 先に、本発明者らは、抗腫瘍性および抗腫瘍活性を持つ新規な抗生物質を提供することを目的に、従来より有用な抗生物質の開発と実用化の研究を促進してきた。その結果、土壌菌から新規な微生物としてアミコラトブシス属に属する菌株を分離することに成功し、またこの菌株について命名されたアミコラトブシスsp. MK 299-9514株が新しい構造を持つ種々の抗生物質を生産していることを見出した。これら新規な抗生物質を単離することに成功し、それらにエポキシノマイシンAおよびエポキシノマイシンBと命名した。更に、これらの新規な抗生物質が革新的性質(メチリシリン耐性等)を有し、グルタミン酸の細胞に抗生物質を示し、また細胞膜の構造を制御する細胞膜活性を有することを見出した(平成7年12月4日出願の特願平 7-315542号明細書参照)。

【0006】

更に、本発明者らは研究を進めたが、その

【特許請求の範囲】

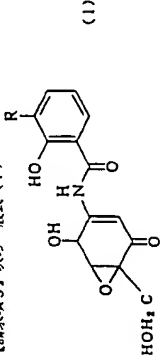
【請求項1】 次の一般式 (1)



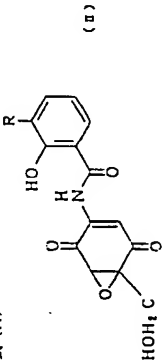
(式中、RはエポキシノマイシンCでは水素原子を示し、またエポキシノマイシンDでは塩基原子を示す) で表わされる化合物である抗生物質エポキシノマイシンCおよびエポキシノマイシンD、またはそれらの塩。

【請求項2】 アミコラトブシス属に属する、請求項1に記載のエポキシノマイシンCおよびDの生産菌を、培養地に培養し、その培養物からエポキシノマイシンCおよび(または) Dを採取することを特徴とする、抗生物質エポキシノマイシンCおよび(または) エポキシノマイシンDの製造法。

【請求項3】 次の一般式 (1)



(式中、RはエポキシノマイシンCでは水素原子を示し、またエポキシノマイシンDでは塩基原子を示す) で表わされる化合物である抗生物質エポキシノマイシンCおよびエポキシノマイシンD、ならびに次の一般式 (11)



(式中、RはエポキシノマイシンAでは塩基原子を示し、またエポキシノマイシンBでは水素原子を示す) で表わされる化合物である抗生物質エポキシノマイシンAおよびエポキシノマイシンB、あるいはこれらの塩から選ばれる少なくとも一つの化合物を有効成分として含有することを特徴とするリウマチ剤。

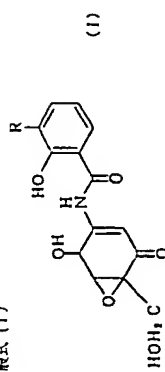
【発明の詳細な説明】

結果、アミコラプトシス菌に属する前記のエボキシキノマイシンAおよびB生産菌は、エボキシキノマイシンAおよびBと化学構造が共通するが別個の新規な化合物2種を生産していることを見いだした。今回、これら新規な化合物2種を単離することに成功し、それぞれにエボキシキノマイシンCおよびエボキシキノマイシンDと命名した。

【0007】また、本発明者らは、微生物の代謝産物の中から抗リウマチ活性を示す物質を探索する研究を継行行なっていたので、今回発見したエボキシキノマイシンCおよびエボキシキノマイシンDが抗リウマチ活性を有するが研究した。その結果、本発明にかかわるエボキシキノマイシンCおよびエボキシキノマイシンDが慢性関節リウマチの動物実験モデルであるコラーゲン誘発関節炎を抑制することを見いだした。また、先に本発明者らが発見したエボキシキノマイシンAおよびエボキシキノマイシンBも抗リウマチ活性を有することを見いだした。これらの知見に基づいて、本発明が完成された。

【0008】なお、本発明者らが今回新たに得たエボキシキノマイシンCおよびエボキシキノマイシンDは、特定の細胞に対して弱い抗細胞活性を示したが、各種の細胞の増殖を抑制する活性がかなり低いことが認められた。

【0009】従って、第1の本発明においては、次の一般式(1)



E) マススペクトル (m/z) : 292 (M+H)⁺

290 (M-H)⁻

F) 高分解能マススペクトル: 実験値 292.0821 (M+H)⁺

計算値 292.0804

λ_{\max} nm (ε) 296 (18140)

J) 赤外線吸収スペクトル (KBr錠剤法): 添付図面の図3に示す。

(1) メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図1に実験値を示す。主なピークは次のとおりである。

λ_{\max} nm (ε) 3431, 1604, 1537, 1460, 1309, 1232, 1065, 750

J) ¹³C-NMRスペクトル (CD₃OD/TMS): 添付図面の図3に示す。

K) ¹H-NMRスペクトル (CD₃OD/TMS): 添付図面の図4に示す。

(2) エボキシキノマイシンDの物理化学的性状

A) 外觀及び性質: 黄かっ色粉体、弱酸性物質

B) 融点: 163-168℃ (分解)

C) 比旋光度: [α]_D²⁵ +142° (c 1.0, メタノール)

(式中、RはエボキシキノマイシンCでは水素原子を示し、またエボキシキノマイシンDでは塩素原子を示す)で表わされる化合物であるエボキシキノマイシンCおよびエボキシキノマイシンD、あるいはこれらの塩が提供される。

【0010】エボキシキノマイシンCおよびDは、弱酸性物質であり、それらの塩としては第4級アンモニウム塩などの有機塩基との塩、あるいは各種金属との塩、例えばナトリウムのようなアルカリ金属との塩があり、これらの塩も上記の抗リウマチ活性を有する。

【0011】次に、抗生物質エボキシキノマイシンCおよびDの物理化学的性状を記載する。

(1) エボキシキノマイシンCの物理化学的性状

A) 外觀及び性質: 白色粉体、弱酸性物質

B) 融点: 168-172℃ (分解)

C) 比旋光度: [α]_D²⁵ +128° (c 1.0, メタノール)

D) T.L.CのRf値: 0.31

シリカゲル (Kt.105715, メルク社製) の薄層クロマトグラフィーで展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (10:1) で展開して測定した場合

ル)
D) T.L.CのRf値: 0.10
シリカゲル (Kt.105715, メルク社製) の薄層クロマト

E) マススペクトル (m/z) : 326 (M+H)⁺

324 (M-H)⁻

F) 高分解能マススペクトル: 実験値 326.0417

計算値 326.0417

G) 分子式: C₁₈H₁₆NO₆

H) 紫外線吸収スペクトル:

(1) メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図5に実験値を示す。主なピークは次のとおりである。

λ_{\max} nm (ε) 299 (17590)

(11) 0.01N NaOH-メタノール溶液中で測定した吸収スペクトルは添付図面の図5に点線を示す。主なピークは次のとおりである。

λ_{\max} nm (ε) 304 (18950), 367 (9230)

(111) 0.01N HCl-メタノール溶液中で測定したUVスペクトルは添付図面の図5に点線を示す。主なピークは次のとおりである。

λ_{\max} nm (ε) 297 (18530)

I) 赤外線吸収スペクトル (KBr錠剤法): 添付図面の図6に示す。

λ_{\max} (cm⁻¹) 3438, 1643, 1533, 1281, 1200

J) ¹³C-NMRスペクトル (CD₃OD/TMS): 添付図面の図7に示す。

K) ¹H-NMRスペクトル (CD₃OD/TMS): 添付図面の図8に示す。さらに、抗生物質エボキシキノマイシンCおよびDの生物学的性状を次に記載する。

【0012】A) コラーゲン誘発関節炎抑制作用

コラーゲン誘発関節炎に対する効果を1群5〜8のDBA/

ガラファンで展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (10:1) で展開して測定した場合

326 (M+H)⁺

324 (M-H)⁻

計算値 326.0417

1) 慢性マウスを用いて調べた。すなわち、タイプIIコラーゲンを等容量のフロイントのコンブリートアジュバントと共に乳して1mg/0.1mlの投与液を作製した。これをマウスの尾背部の皮内に0.1ml接種して感作した。3週間後に同様の操作法で乳化したタイプIIコラーゲンの0.1mlをマウスの腹腔内に投与して追加免疫を行ない、関節炎を誘発させた。

【0013】エボキシキノマイシンのAおよびCの2mg/kgまたは4mg/kg、ならびにエボキシキノマイシンBの1mg/kgまたは2mg/kgを最初のコラーゲン接種の日より1週間に3回、合計6週間腹腔内投与した。コラーゲン誘発関節炎の抑制効果は動脈および後肢の腫瘍、腫瘍および腫瘍の程度による0〜4のスコア (4肢の合計の最高点は16) により評価した。スコア0は全く症状がみられない場合、スコア1は四肢の指など小関節が1本のみ発赤、腫瘍を示す場合、スコア2は小関節が2本以上、あるいは手首、足首などの比較的大きな関節が発赤、腫瘍を示す場合、スコア3は1本の手や足全体が発赤、腫瘍を示す場合、さらにスコア4は1本の手や足の全体的な腫瘍が最大限に達し、しかも関節の腫瘍を伴っていることと判断した場合をそれぞれ示す。結果を表1に示す。

【0014】

ガラフィーで煎固乾燥としてクロロホルム-メタノール (10:1) で煎固して測定した場合。
 【0042】 E) 分子式: $C_{10}H_{16}NO_4$ C1
 F) 紫外線吸収スペクトル: メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルの主なピークは次のとおりである。

λ_{max} nm (ε) 236 (sh, 8000), 255 (sh, 5900), 325 (8000), 370 (sh, 2700)
 C) 紫外線吸収スペクトル (KBr錠剤法)
 ν_{max} (cm⁻¹) 3450, 1710, 1670, 1600, 1520, 1460, 1340, 1230

【0043】 (2) エポキシノマイシンBの理化学的性質

A) 外観及び性質: 淡黄色固体、揮発性物質
 B) 融点: 178~184℃ (分解)
 C) 比旋光度: $[\alpha]_D^{25} +32.2^\circ$ (c 0.51, メタノール)
 D) T.L.CのRf値: 0.52

シリカゲル (Art. 105715, メルク社製) の薄層クロマトグラフィーで煎固乾燥としてクロロホルム-メタノール (10:1) で煎固して測定した場合。

【0044】 E) 分子式: $C_{10}H_{16}NO_4$

F) 紫外線吸収スペクトル: メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルの主なピークは次のとおりである。

λ_{max} nm (ε) 237 (6100), 253 (sh, 5400), 326 (6300)
 C) 紫外線吸収スペクトル (KBr錠剤法)
 ν_{max} (cm⁻¹) 3430, 1710, 1660, 1610, 1530, 1340, 1230

【0045】 第3の本発明による抗リウマチ剤で有効成分として用いられるエポキシノマイシンCおよびDならびにエポキシノマイシンAおよびBは、前記のとおり、慢性関節リウマチの動物実験モデルであるコラーゲン誘発関節炎を抑制する活性を有する。エポキシノマイシンCおよびDならびにエポキシノマイシンAおよびBは特に抗リウマチ剤として使用される場合に、それらの投与量は直投により質なるが一般に成人1日量10~200mg、好ましくは20~600mgであり、症状に応じて必要により1~3回に分けて投与するのがよい。投与方法は投与に適した形態をとることができ、特に経口投与あるいは経腸的投与が望ましい。

【0046】 エポキシノマイシンA~Dは、前記に示すとおり、コラーゲン誘発関節炎に対する抑制作用を有するから、慢性関節リウマチのみならず、自己免疫性関節炎、結節性動脈硬化、潰瘍性大腸炎および慢性腎臓病などの自己免疫疾患の予防または治療にも有効に適用することが期待できる。

【0047】

【発明の短縮の形態】 次に其発明により本発明を更に詳

細に説明するが、本発明は下記の実施例に規定されるものでない。
 【0048】 実施例1 抗生物質エポキシノマイシンCおよびDならびにエポキシノマイシンAおよびBの製造

(A) グリセリン 0.5%、シュウクロース 2%、大豆粉 1%、乾酵母 1%、コーン・ステープ・リカー 0.5%、塩化コバレン 0.001%を含む液体培地 (pH7.0に調整) を三角フラスコ (500ml) に 10mlずつ分注し、常法により 120℃で20分滅菌した。これらの培地に、等量斜面培地に培養したアミコラプトシス sp. MK299-95F 4株 (FERID P-15243) を接種し、その後30℃で5日間回転培養した。これにより種培養液を得た。
 【0049】 グリセリン 2%、デキストリン 2%、バクトゾイトン 1%、粉末酵母エキスを0.3%、硫酸アンモニウム 0.2%、炭酸カルシウム 0.2%、シリコーンオイル1滴を含む液体培地 (pH7.4に調整) を三角フラスコ (500ml) に 10mlずつ分注し、常法により 120℃で20分滅菌した。その後、これらの培地に、上記種培養液をそれぞれ2mlずつ接種し、27℃で4日間回転培養した。

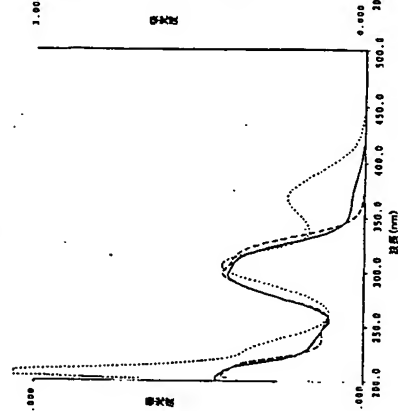
【0050】 このようにして得られた培養液を遠心分離して固体を除き、培養液 1.8リットル (L) は、6N-HClによりpH2にした後に酢酸ブチル1.8リットルを出して、酢酸ブチル層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。酢酸ブチル層を減圧下で濃縮乾燥し、残液をメタノール50mlに溶かしヘキサノン50mlで2回洗浄した。メタノール層を減圧下で濃縮乾燥すると茶色の油状物 (980mg) が得られた。この油状物をシリカゲルカラム (Nerc k, Kieselgel 60, 120ml) に付し、トルエン-アセトン系 (10:1, 5:1, 3:1) で順次溶出するとエポキシノマイシンAが16mg、エポキシノマイシンBが19mg、エポキシノマイシンCおよびDの混合物が170mg得られた。この混合物の50mgをシリカゲルTLC (Nerc k, Art. 105715, クロロホルム-10%希水メタノール=10:1で3回展開) で分離精製すると白色固体のエポキシノマイシンCが13mg得られ、また黄褐色粉末のエポキシノマイシンDが23mg得られた。すなわちエポキシノマイシンCが融点 168~172℃ (分解) の白色粉末として13mgの収量で得られ、またエポキシノマイシンDが融点 163~168℃ (分解) の黄褐色粉末として23mgの収量で得られた。

(B) なお、前記の(A)項と同様にして得られた培養液を濾過して固体を分離した。培養液 2.55リットル (L) を、6N-HClによりpH2にした後に酢酸ブチル2.55Lを出し、酢酸ブチル層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。酢酸ブチル層を減圧下で濃縮乾燥し、残液をメタノール50mlに溶かしヘキサノン50mlで2回洗浄し、メタノール層を減圧下で濃縮乾燥した。得られた液をクロロホルム-メタノール-水 (50:10:40, 100ml

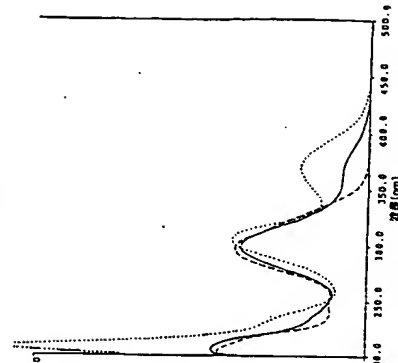
1) で分配し、下層を減圧下で濃縮乾燥すると、茶色の油状物 (0.515g) が得られた。この油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Kieselgel 60, メルク社製, 50ml) に付し、トルエン-アセトン混合溶媒 (10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 2:1) で順次溶出した。得られた活性画分を同条件のシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、トルエン-アセトン混合溶媒 (50:1, 20:1, 10:1, 7:1) で順次溶出した。エポキシノマイシンAおよびBの混合物が124mg得られた。この混合物の35mgをシリカゲルTLC (展開溶媒: クロロホルム-メタノール, 20:1) にかけて分離精製した。エポキシノマイシンAが融点 168~173℃ (分解) の淡黄色粉末として20mgの収量で得られ、またエポキシノマイシンBが融点 178~184℃ (分解) の淡黄色粉末として10mgの収量で得られた。

【図面の簡単な説明】
 【図1】 エポキシノマイシンCのメタノール溶液中、0.01N HCl-メタノール溶液中および0.01N HCl-メタノール溶液中のそれぞれの紫外線吸収スペクトルである。

【図1】



【図5】



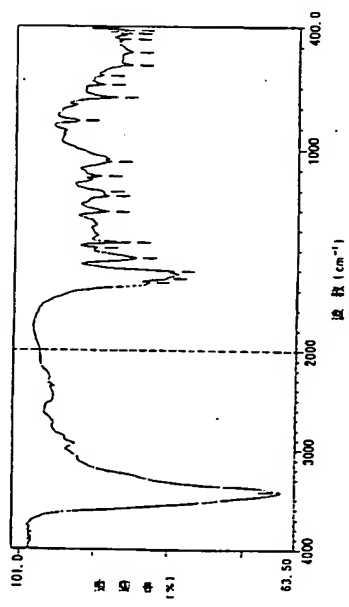
【図2】 エポキシノマイシンCのKBr錠剤法で測定した紫外線吸収スペクトルである。
 【図3】 エポキシノマイシンCのメタノール溶液 (内部標準: トリメチルシリラン) にて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトルである。
 【図4】 エポキシノマイシンCのメタノール溶液 (内部標準: トリメチルシリラン) にて測定した炭素13核磁気共鳴スペクトルである。
 【図5】 エポキシノマイシンDのメタノール溶液中、0.01N HCl-メタノール溶液中および0.01N HCl-メタノール溶液中のそれぞれの紫外線吸収スペクトルである。
 【図6】 エポキシノマイシンDのKBr錠剤法で測定した紫外線吸収スペクトルである。
 【図7】 エポキシノマイシンDのメタノール溶液 (内部標準: トリメチルシリラン) にて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトルである。
 【図8】 エポキシノマイシンDのメタノール溶液 (内部標準: トリメチルシリラン) にて測定した炭素13核磁気共鳴スペクトルである。

特開平 10-45738

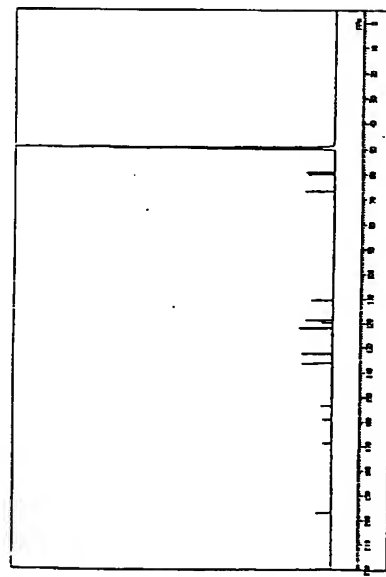
(12)

特開平 10-45738

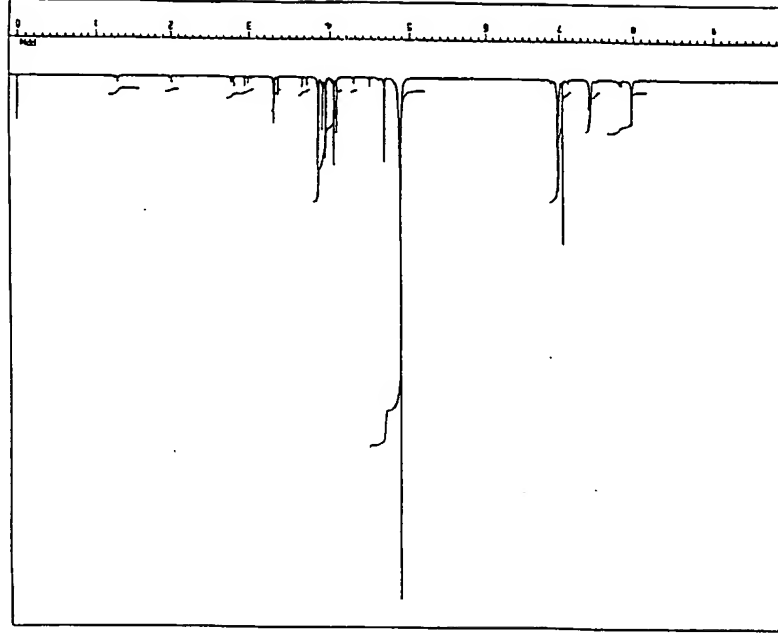
【図2】



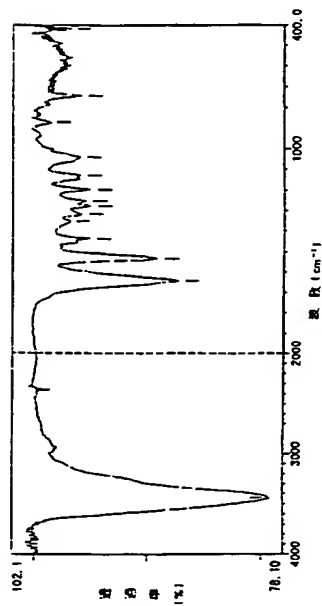
【図3】



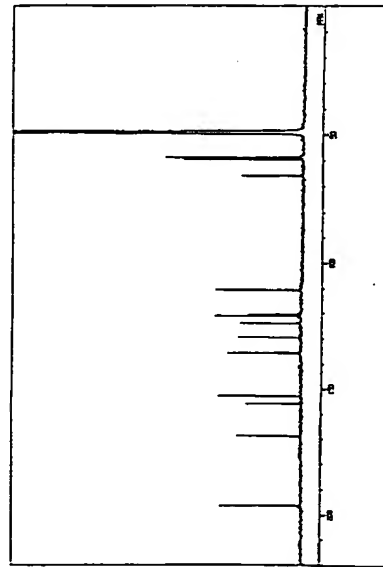
【図4】



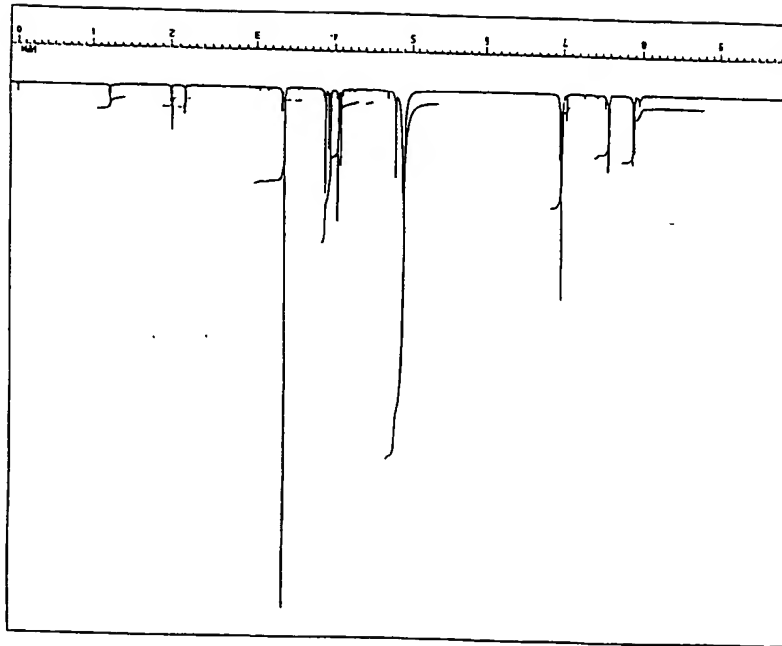
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

- | | | | |
|---------|----------------------|---------|---------------------------------|
| (72)発明者 | 飯沼 寛信 | (72)発明者 | 濱田 雅 |
| | 神奈川県横浜市緑区白山4丁目61番17号 | | 東京都新宿区内藤町1番地26 秀和レジデンス405号 |
| (72)発明者 | 澤 力 | (72)発明者 | 平野 伸一 |
| | 神奈川県横浜市緑区西4丁目6番7号 | | 神奈川県茅ヶ崎市本村5丁目8番1-207 |
| (72)発明者 | 森橋 博 | (72)発明者 | 松本 啓樹 |
| | 東京都大田区田園調布北町3番17号 | | 神奈川県横浜市旭区さちが丘11番地3 菊1グリーンコーポ102 |

特開平10-45738

(15)

(72)発明者 石塚 雅也
静岡県三島市西宮町6番5号 パストラル
ハイム電話館411

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.